



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 32 007 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:
G 01 N 1/30
G 01 N 21/64

②① Aktenzeichen: 198 32 007.8
②② Anmeldetag: 16. 7. 1998
④③ Offenlegungstag: 27. 1. 2000

DE 198 32 007 A 1

⑦① Anmelder:
Kärcher, Meta, 76327 Pfinztal, DE

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
US 43 45 027
EP 08 01 306 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Methode zur fluoreszenzmikroskopischen Unterscheidung lebender und toter Mikroorganismen

⑤⑦ Seit dem Jahre 1977 existiert eine Acridinorange-Differentialfärbung der Bakterien in fixierten klinischen Proben. Aber sie ermöglicht nur die Differenzierung zwischen orange-fluoreszierenden Bakterien und grün-gelblicher Fluoreszierung der menschlichen Zellen und dem Hintergrund. Die neue Methode soll erlauben die Differenzierung zwischen lebenden (grün) und toten (rot) Bakterienzellen.

Das Ziel wird erreicht durch die Fixierung mit Paraformglutaraldehyd, Färbung mit Acridinorange und Bewertung der Ergebnisse mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Die Methode eignet sich für:

• eine vorläufige Orientierung über den Erreger: (Mono- oder Mischkultur)

Unterscheidung lebender oder toter Bakterienzellen und kann eingesetzt werden in den folgenden Gebieten: Mikrobiologie, Nephrologie, Urologie, Neurologie, Ginekologie usw.

DE 198 32 007 A 1

Die Erfindung gehört zur Medizin und zwar zur Mikrobiologie. Es ist eine Acridinorange-Fluoreszenz-Färbung der fixierten Präparate bekannt (Kronvall, G., Myhre, E., "Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at a low pH.", Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica (B) 1977, 85: 249-254.

Mit diesem Fluorochrom können verschiedene Mikroorganismen, z. B. Bakterien oder Pilze gesehen werden. Der Mangel dieser Methode besteht, unserer Meinung nach, darin, daß bei beliebiger pH-Akridinorange-Lösung die Bakterien und Pilze nur orange-rot fluoreszieren. Gemäß den Untersuchungen von Herrn Strugger, S. & Hilbrich, P. "Die Fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Bakterienzellen mit Hilfe der Akridinorangefärbung. Deutsche Tierärztl. Wochenschr. 50: 121-130, 1942, S. 129" kann die vitale Acridinorange-Fluorochromierung zur exakten fluoroskopischen Unterscheidung lebender und toter Zellen gesichert bezeichnet werden. "Im pH-Bereich zwischen 5 und pH 8 ist es infolge konzentrationsbedingter Änderungen des Fluoreszenzspektrums möglich, lebendige und tote Bakterienzellen durch verschiedene Fluoreszenzfarben mikroskopisch auseinanderzuhalten. Das lebende Bakterienplasma fluoresziert grün, während das tote, kupferrot fluoresziert. Das bisher übliche Ausstrichverfahren läßt sich für diese Fluorochromierung nicht anwenden."

Der im Patentanspruch angegebenen Erfindung liegt das Problem zugrunde, die lebende und tote Zellen in fixierten Präparaten zu unterscheiden.

Dieses Problem wird durch die im Patentanspruch ausgeführten Merkmale gelöst: eine klinische Probe wird

- vorläufig mit Paraformglutaraldehyd fixiert
- danach mit Acridinorange gefärbt
- mit Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen darin, daß die Fixierung mit Paraformglutaraldehyd vor der Materialapplikation beugt der Zellveränderung vor und erlaubt einen breiten Farbenspektrum fluoreszierenden Bakterien bekommen. Mit anderen Worten gesagt, die Methode vereinigt die beide Methoden von Herrn Kronvall, G., Myhre, E., und Strugger, S., Hilbrich, P.,

Hier wird der Ausführungsbeispiel der Erfindung beschrieben:

Fixierung der klinischen Probe: 10 ml frischer Spontan Urin werden bei 2000 Umdrehungen/min. für 5 Minuten zentrifugiert, anschließend der Überstand abgeschüttelt. Das Sediment im Verhältnis 1 : 1 mit Paraformglutaraldehyd mindestens 30 Minuten fixiert. Das fixierte Sediment durch erneutes 5-minütiges Zentrifugieren bei 2000 Umdrehungen/min vom Fixativ getrennt, den Überstand abgossen und das Sediment im Phosphat Puffer nach Sörensen pH 6,8-7,2 resuspendiert.

Färbung: Lufttrockene Präparate für 10 Minuten in eine mit Puffer Sörensen pH 6,8-7,2 verdünnte Acridinorange-Lösung (1 : 25000) tauchen, danach zweimal nacheinander für jeweils 1 Minute im Puffer spülen. Farbstoffreste auf der Objektträgerunterseite mit einem Tuch entfernen und Präparat schräggestellt bei 37°C Lufttrocknen.

Mikroskopie: Die Auswertung der Präparate wird mit einem Fluoreszenzmikroskop vorgenommen.

Ergebnisse: Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen insbesondere darin, daß die Bakterien in einem breiten (grün-orange-rot) Farbenspektrum fluoreszieren.

Methode zur fluoreszenzmikroskopischen Unterscheidung lebender und toter Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß eine klinische Probe vorläufig mit Paraformglutaraldehyd fixiert, danach mit Acridinorange gefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wird.